提高源自 *Bacillus circulans* 251 的β-CGTase 对麦芽糖亲和性及其在生产海藻糖中的应用*

杜立[1,2,3] 宿玲恰[1,2,3] 吴 敬[1,2,3,**]

([1]江南大学 食品科学与技术国家重点实验室 无锡 214122

[2]江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122

[3]江南大学 教育部食品安全国际合作联合实验室 无锡 214122)

摘要 将 *B. circulans* 251 β-CGTase 应用于海藻糖制备，海藻糖转化率从 50.4%提高至 71.9 %。为进一步提高底物的转化率，运用易错 PCR-高通量筛选技术筛选对以麦芽糖为歧化反应受体的亲和性提高的 B. circulans 251 β-CGTase 突变体。利用低底物浓度的 96 孔板 4,6-亚乙基-对硝基苯-α-D-麦芽七糖苷（EPS）显色法，最终筛选得到了一株对麦芽糖亲和性提高的突变体 M234I。将野生型β-CGTase 和突变体酶 M234I 进行蛋白纯化，测定其酶学性质，结果表明：突变体的比活为 345.25 U/mg，野生型则为 357.63 U/mg；突变体 M234I 对麦芽糖的 Km 为 0.2582 mM，仅为野生型（0.4749 mM）的 54.4%，对麦芽糖的亲和性显著提高；突变体的最适温度，最适 pH 较野生型未发生较大变化。以麦芽糊精(DE 值 16)为底物，将突变体 M234I 用于多酶复配体系生产海藻糖，酶反应结果表明海藻糖的转化率最高达 74.9 %，较野生型β-CGTase 提高约 3%。

关键词：β-CGTase，易错 PCR，分子改造，亲和性，海藻糖转化

Enhancing Maltose Affinity of *Bacillus circulans* 251 β-CGTase and its Application in Trehalose Preparation

DU Li[1,2] SU Ling-qia[1,2] WU Jing[1,2]

(1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University,Wuxi 214122，China)

(2 School of Biotechnology and Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

* 国家自然科学基金(31771916，31425020)资助项目

** 通讯作者，电子信箱：jingwu@jiangnan.edu.cn

Abstract *B. circulans* 251 β-CGTase was applied to trehalose preparation, and the trehalose yield was increased from 50.4% to 71.9%. In order to further improve the conversion rate of substrates, *B. circulans* 251 β-CGTase mutants with improved affinity for maltose as a disproportionation acceptor were screened thorugh error-prone PCR and high-throughput screening. Mutant M234I with higher affinity for maltose was selected with a low concentration of 4,6-ethylidene-p-nitrophenyl-indole-D-maltoheptaose (EPS) chromogenic method. The wild-type β-CGTase and the mutant enzyme M234I were purified, and the enzymatic properties were characterized. The specific activity of the mutant M234I was 345.25 U/mg (disproportionation activity), while that of the wild type was 357.63 U/mg. The maltose K_m vaule of the mutant M234I was 0.2582 mM, which was only 54.4% of the wild type (0.4749 mM), which indicates that its affinity for maltose was significantly improved. The optimum temperature and the optimum pH of the mutant did not change much compared with those of the wild type. The mutant M234I was used in the multi-enzyme complex system to produce trehalose with maltodextrin (DE 16) as substrate, the result showed that the trehalose yield was up to 74.9 %, which was 3% higher than that of the wild-type β-CGTase.

Key words: β-CGTase，Error-prone PCR，Molecular modification，Affinity，Trehalose conversion

环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase，EC 2.4.1.19)属于糖苷水解酶家族 13[1]，是一种胞外定位的多功能酶，能够催化多种不同的反应，包括偶合、环化和歧化三种转糖基反应和一种微弱的水解反应[2,3]。根据其通过环化反应生产环糊精的产物特异性，又常把 CGTase 分为α-CGTase、β-CGTase、γ-CGTase[6]。

在 CGTase 的三种转糖基反应中，歧化反应占主导地位[4]，该反应能将直链麦芽寡糖被切断的部分转移至另一受体上，使得受体链变长[5]，是一种分子间转糖基反应。CGTase 的转糖基能力可将各类糊精、糖链及淀粉分子作为糖基供体，通过歧化或耦合反应将糖苷接至受体上，从而改善受体分子的结构以提升其使用性能，如改善甜菊苷的甜味特性，提高查耳酮甜味料的溶解度，以及制备维生素 C（AA）稳定性提高的衍生物 AA-2G[7-8]，制备松二糖和偶合糖等[9-10]。而 CGTase 的转糖基能力也可被用在多酶复配反应体系，于反应中起到重要的辅助作用，显著提高底物利用率，如复配生产海藻糖的酶反应体系加入 CGTase 同样可以通过

将体系中的剩余的小分子糖受体糖链延长，使之能被麦芽寡糖基海藻糖合成酶进一步利用于合成麦芽寡糖基海藻糖来提高底物利用率[11]。

B. circulans 251 来源的 CGTase 是一种典型的β-CGTase，其在歧化反应中对小分子糖有较高的受体亲和性[12]。本研究考察了其在多酶体系复配生产海藻糖中的应用，并通过易错 PCR 技术结合高通量筛选技术对 *B. circulans* 251 来源的 CGTase 进行定向进化，以期获得在应用中效果更佳的突变体酶。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

菌株 *E. coli* JM 109 和 *E. coli* BL21（DE3）为本实验室前期保藏，质粒 pMD19-T（simple）购自 Takara（大连）公司，质粒 pET-20b(+)和 *B. circulans* 251 来源的环糊精葡萄糖基转移酶基因*β-cgt* 为本实验室前期保藏[13]。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基，LB 固体培养基， TB 培养基[13]。

1.1.3 酶和试剂

限制性内切酶(*Nde* I、*Hin*d III)、rTaq DNA 聚合酶、蛋白 Marker 标准品、DL 5000 和 DL 10000 DNA Marker 等购自 Takara（大连）公司；T4 DNA Ligase DNA 连接酶购自美国 NEB 公司；质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒购自康为世纪公司；海藻糖，麦芽糖，葡萄糖，麦芽糊精（DE 值 16）购自 Sigma 公司；乙腈（HPLC 纯）购自上海安谱科学仪器有限公司； EPS、卡那霉素、氨苄青霉素购自百灵威科技有限公司；其他常规试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 β-CGTase 基因的易错 PCR

以实验室早期保藏的 *B. circulans* 251 的 CGTase 基因*β-cgt* 作为易错 PCR 的模板，并设计引物 CGT-ePCR-F: 5-’ CATGCCATGGCACCGGATACCAGCGTT -3’, CGT-ePCR-R:5-’ GGGAAGCTTACGGTTGCCAATTCACGT -3’，下划线部分为限制性酶切位点。PCR 体系（50 μl）：ddH$_2$O (30.7 μl)，Mg^{2+} (25 mM,8.0 μl)，Mn^{2+} (10 mM,0.3 μl)， 10×rTaq buffer (5 μl), 质粒 DNA 模板 (0.5 μl)， 引物

CGT-ePCR-F (10 uM,0.5 μl)， 引物 CGT-ePCR-R (10 uM,0.5 μl), dNTP Mix(2.5 mM,4 μl)， rTaq DNA 聚合酶(5 U/μl ,0.5 μl)。PCR 过程：94℃预变性 4 min，98℃变性 30 s，55℃退火 10 s，72℃延伸 2 min 10 s，30 个循环，最后 72℃延伸 10min，4℃保温。

1.2.2 突变文库的构建

使用胶回收试剂盒将易错 PCR 产物回收，并将回收的目的基因与克隆载体 pMD19-T(simple)连接，转化克隆宿主 *E. coli* JM109，并涂布于 LB 抗性平板（含 100 μg/mL Amp），置于 37℃培养箱培养过夜，用 LB 液体培养基（含 100 μg/mL Amp）将固体平板上的所有阳性克隆洗脱，37℃，200 r/min，培养 3-5 h，用质粒抽提试剂盒抽提混合质粒，并用 *Nde* I 和 *Hin*d III 进行双酶切，与表达载体 pET-20b 相连接。将连接产物转化至 *E. coli* BL21（DE3）表达宿主中，涂布于 LB 抗性平板（含 100 μg/mL Kana），即完成突变文库构建。

1.2.3 突变文库的筛选

使用高通量挑菌工作站 (Molecular Devices，Qpix 2) 从固体 LB 抗性平板上挑取单克隆并接至含有 600 μL 液体 LB 培养基 (含 100 μg/mL Kana) 的 96 孔深孔板中，并于 37 ℃、900 r/min 下培养 8-10 h，从中转接 50 μL 种子培养基到含有 600 μL 新鲜 TB 培养基的 96 深孔板中，37 ℃，900 r/min，培养 2 h，加入终浓度为 5 mM 的 IPTG ，于 25 ℃下诱导表达 48 h。将发酵液于 4000 r/min、4 ℃下离心 20 min ，取发酵上清，适度稀释后进行酶活测定。200 μl 0.5 mM 的 EPS 和 0.25 mM 的麦芽糖溶液作为底物，于 50℃水浴锅中预热 10 min，加入 30 μl 稀释后的粗酶液，精确反应 75 min，于沸水中煮沸 10 min，冷却，加入 40 μl α-葡萄糖苷酶和 130 μl 去离子水，混匀，于 60℃水浴锅反应 60 min 以上，加入 100 μl 1M Na_2CO_3 溶液，混匀，取 200 μl 于酶标板中，在 400 nm 处检测吸光值。根据吸光值的大小，筛选出在该底物浓度下酶活相对野生型高的突变体酶。测定酶活提高的突变体酶对底物麦芽糖的 K_m 值，将得到的 K_m 值降低的突变体送苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。

1.2.4 β-CGTase 的歧化活力测定

歧化活力测定方法基于 van der Veen 等[12]的方法修改得到。以 50 mmol/L pH 5.5 的磷酸盐缓冲液为溶剂，分别配置 12 mM 的 EPS 和 20 mM 麦芽糖溶液，各

取 300 μL 的 12 mM EPS 和 20 mM 麦芽糖溶液置于 50 ℃水浴锅中预热，加入 100 μL 稀释后的酶液，精确反应 10 min 后，立刻煮沸 10 min 终止反应，加入 30 μl 稀释后的粗酶液，精确反应 75 min，于沸水中煮沸 10 min，冷却，加入 100 μl α-葡萄糖苷酶和 100 μl 去离子水，混匀，于 60℃水浴锅反应 60 min 以上，加入 100 μl 1M Na_2CO_3 溶液，混匀，最后于 400 nm 测定吸光值。CGTase 的歧化活力酶活定义为：在 50 ℃时，其他条件恒定，每分钟转化 1 μmol EPS 的酶量。

1.2.5 β-CGTase 的表达及纯化

将能够表达野生型β-CGT 和突变型酶的 *E. coli* BL21（DE3）接种于 10 mL LB 液体培养基（含 100 μg/mL Kana），37 ℃培养 8-10 h，按 5%的接种量转接至 TB 培养基（含 100 μg/mL Kana 和 7.5 g/L 甘氨酸 ），37 ℃培养 2h ,加入浓度为 5 mM 的 IPTG，于 25℃，培养 48 h。取发酵液，8000 r/min，离心 15 min 后收集上清，即为粗酶液。

将粗酶液进行 30%硫酸铵沉淀，透析，经过阴离子交换柱 Mono Q 进行蛋白纯化。使用 Bradford 法进行测定蛋白含量[15]。纯化后的β-CGT 及其突变体用于酶学性质及动力学参数的测定。

1.2.6 酶学性质探究

(1)最适温度

分别将底物置于 35℃~70℃（梯度为 5℃）水浴锅中预热，按照方法 1.2.4 所述的方法测定酶活，定义最高酶活为 100%。

(2)温度稳定性

将酶液用 pH 6.0 的缓冲液稀释后，置于 50℃中保温，定期取样，按照方法 1.2.4 所述的方法测定残余酶活，设定 0 h 酶活为 100%。

(3)最适 pH

用 50 mmol/L pH 4.0~8.0（梯度为 0.5）的缓冲液溶解底物，配成 6 mM 的 EPS 和 20 mM 的麦芽糖溶液，将底物置于 50℃水浴锅中预热，按照 1.2.4 的方法测定酶活，定义最高酶活为 100%。

(4)pH 稳定性

将酶分别置于 50 mmol/L pH 4.0~8.0（梯度为 0.5）的缓冲液中，于 4℃静置 24 h，按照 1.2.4 的方法测定酶活，定义 0 h 酶活为 100%。

(5) K_m和 k_{cat}值的测定

用 50 mmol/L pH 5.5 磷酸缓冲液溶解底物，配成 0.25 mM，0.5 mM，0.75 mM，1 mM，1.5 mM，2 mM，3 mM，5 mM，10 mM，20 mM，50 mM，100 mM 的麦芽糖溶液，将底物置于 50℃水浴锅中预热，按照 1.2.4 的方法测定酶活。使用 GraphPad Prism 软件进行拟合分析，结合拟合分析结果计算得到 K_m值和 k_{cat}值。

1.2.7 β-CGTase 应用于双酶法生产海藻糖

用磷酸二氢钠-磷酸二氢钾缓冲液中配置 20% w/w 的 DE 值约为 16 的麦芽糊精溶液，加入 5 U/g 底物的普鲁兰酶、2.5 U/mL 麦芽寡糖基海藻糖合成酶、2.5 U/mL 麦芽寡糖基海藻糖水解酶以及 0.6~2.4 U/mL CGT 酶（以歧化活力计），调节 pH 至 5.5，在 120~180 r/min 的转速下于 45 ℃的水浴摇床中进行酶催化反应 30~35h，后沸水浴灭酶得到反应液 A；将所得的反应液 A 调节到 pH 为 4.4，加入复合糖化酶于 60℃糖化 24h。高效液相色谱（Agilent Technologies，1260）检测转化产物，计算海藻糖转化率。高效液相色谱分析采用氨基柱，检测条件如下：流动相，乙腈：水（80:20）；柱温，30 ℃；流速，0.8 mL/min；检测器为示差折光检测器（RID）。

1.2.7 β-CGT 酶的结构预测及突变位点分析

野生型的β-CGT 的蛋白晶体结构通过 protein data bank 数据库中获得（PDB ID 1CXK）[25]，突变体与野生型的平均结构通过 Amber MD 模拟计算获得。

2. 结果与讨论

2.1 *B. circulans* 251 来源的β-CGTase 在海藻糖制备中的应用

按 1.2.7 所述方法进行海藻糖酶转化。在未添加 CGTase 时，酶反应产物糖化后经 HPLC 检测得海藻糖产量仅为 75.6 g/L，其转化率为 50.4 %；而当加入 *B. circulans* 251 来源的β-CGTase 时，反应得到的海藻糖产量提高至 143.8 g/L，其转化率达到了 71.9 %。分析该酶反应结束后的产物，发现加入β-CGTase 的反应液体系中还含有较多的麦芽糖（21.9 g/L）。若能提高β-CGTase 在歧化活力中对麦芽糖为受体的亲和性，从而利用这部分麦芽糖为受体，接长糖链，使之能被继续用于合成海藻糖，则能进一步提高底物利用率和海藻糖的转化率。因此，本研究将通过易错 PCR 技术结合高通量筛选技术对 *B. circulans* 251 来源的 CGTase 进行定向进化，以获得在应用中效果更佳的突变体酶。

2.2 易错 PCR 条件的探究

在易错 PCR 体系中，需要额外加入 Mg^{2+}和 Mn^{2+}，其中，Mg^{2+}能稳定核酸骨架，同时还能影响到 DNA 聚合酶的活性。Mg^{2+}浓度过低，会降低 PCR 的扩增效率；浓度过高，则会产生非特异性扩增。而 Mn^{2+}能降低 DNA 聚合酶对模板的特异性，增加 PCR 过程中碱基互补的出错率。通过对不同浓度 Mg^{2+}和 Mn^{2+}　PCR 的产物测序，根据测序结果和 1~3 个氨基酸突变为宜的突变原则，选择了体系中 Mn^{2+}终浓度为 0.15 mM，Mg^{2+}终浓度为 4 mM。

2.3 突变文库的构建及筛选

经过初步的易错 PCR 条件探究后，在确定的 PCR 条件下扩增β-CGTase 的基因β-cgt，并按照 1.2.2 和 1.2.3 所述方法进行初筛。当突变体的吸光值高于野生型 CGTase 0.1 时，则挑出进行下一轮深孔板复筛。经过 11 批筛选，筛选了约 3000 株菌后，深孔板复筛获得了一株在低底物浓度下酶活相对野生型提高的阳性转化子 H-7。将深孔板复筛获得的阳性转化子，以 5%接种量接种于 TB 液体培养基（含 100 μg/mL Kana），37℃，200 r/min 培养 2h，加入终浓度为 5 mM 的 IPTG 后，于 25℃，200 r/min 培养 48h。取一定发酵液，离心取上清，以 20 mM 或 0.5 mM 浓度的麦芽糖和 6 mM EPS 作为底物，测定其酶活，发现其在 0.5 mM 浓度的麦芽糖下的酶活为野生型的 1.4 倍，20 mM 浓度的麦芽糖下的酶活则为野生型的 95%，初步判断其对麦芽糖亲和性有一定提升。

2.4 突变体的基因测序

对酶活提高的突变体 H-7 进行测序，发现 H-7 的基因在 624，702 和 C1110 三个碱基位点发生突变，其中仅 702 位点导致氨基酸序列产生改变，由 M 改编为 I。其序列分析结果如表 1。确认突变体 H-7 即为 M234I。

表 1　突变体测序结果

Table 1 Sequencing results of the mutant

Mutant	Mutated nucleotide bases	Mutated amino acids
H-7	T624C /G702A/ C1110T	M234I

2.5 野生型和突变体β-CGTase 的蛋白纯化

粗酶液经 30%的硫酸铵使得目的蛋白沉淀，8000 r/min 离心 20 min，获取蛋白沉淀。用磷酸二氢钠-磷酸二氢钾缓冲液（20 mM，pH 7.5）进行蛋白沉淀的复

溶和透析，最后获得蛋白样品。使用 Mono Q 阴离子交换柱对β-CGT 进行纯化，最后获得纯化样品。对样品进行 SDS-PAGE 蛋白电泳，电泳图如图 1 所示，目的蛋白已达到电泳纯。对每一步获得的样品进行蛋白含量和酶活的测定，结果如表所示。结果表明重组β-CGT 的比活力（歧化活力）为 357.63U/mg，突变体 M234I 则为 345.25 U/mg，突变后的酶比活力没有明显变化。

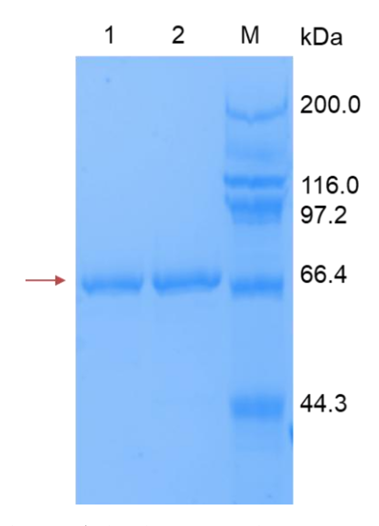


图 1 野生型和突变体酶 M234I 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of wild-type and the mutant

M：Protein Marker (High)　1：Purified wide type β-CGTase 2：Purified mutant M234I

表 2 野生型和突变体 M234I β-CGTase 的纯化结果

Table 2 The protein purified results of wild-type and the mutant (M234I) β-CGTase

Enzyme	Purification steps	Total protein（mg）	Total activity（U）	Specific activity（U/mg）	Recovery rate（%）	Purification fold
M234I β-CGT	Crude extract	329.5	10972.3	33.3	100	1.0
	Salt precipitation	151.1	7768.4	50.4	70.8	1.51
	Mono Q 10/100 GL	2.8	966.7	345.25	8.8	10.37
Wild-type β-CGT	Crude extract	401.1	14086.6	35.12	100	1.0
	Salt precipitation	179.1	10621.3	59.3	75.4	1.69
	Mono Q 10/100 GL	8.6	3075.6	357.63	21.8	10.05

2.6 酶促反应动力学分析

用纯化后的野生型和突变体 M234I β-CGTase 测得的动力学参数结果如表 4 所示。野生型β-CGTase 对麦芽糖的 K_m 值为 0.4749 mM，突变体 M234I 酶对麦芽糖的 K_m 为 0.2582 mM，表明突变体酶对底物的亲和性提高。野生型β-CGTase 对麦芽糖的 k_{cat} 为 488.7 s^{-1}, 突变体 M234I 酶对麦芽糖的 k_{cat} 为 453.2 s^{-1}。

表 3 野生型和突变体 M234I β-CGTase 的酶学动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of wild-type and the mutant M234I β-CGTase

Enzyme	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}\cdot s^{-1}$)
Wild type	488.7	0.4749	1029.2
M234I	453.2	0.2582	1755.4

2.7 β-CGT 野生型及突变体的酶学性质分析

2.7.1 最适温度及温度稳定性分析

突变体 M234I 和野生型β-CGTase 的最适反应温度和温度稳定性测定结果如图 3 和图 4，图 5，图 6，图 7 所示。从图 3 可知，野生型和突变体 M234I β-CGTase 的最适温度均为 60℃，突变体的最适反应温度没有发生大的改变。而由图 4 可知，其 45℃，50℃，55℃，60℃下的半衰期分别为 10.2 h，1.9 h，15 min 和 3 min,而野生型的半衰期则分别为 13.1 h，2.9 h，39 min 和 5 min，突变体 M234I β-CGTase 的温度稳定性较野生型β-CGTase 略有降低，两者在高温环境中的稳定性均较差。

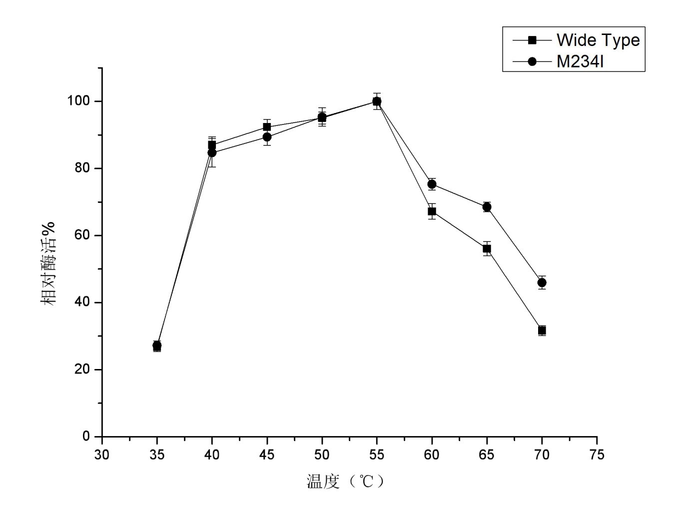
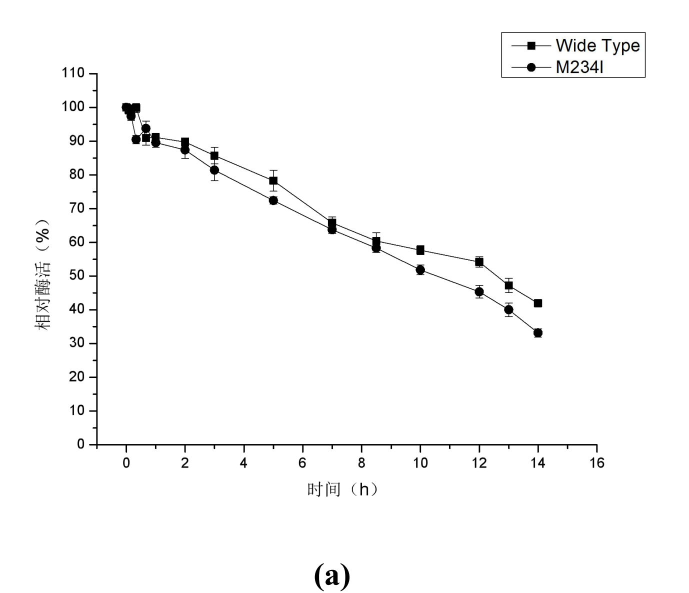
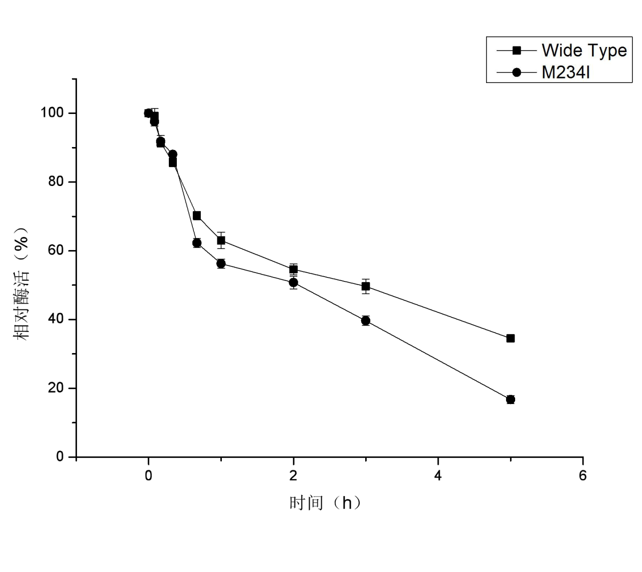


图 2 野生型和突变体 M234I β-CGTase 的最适温度

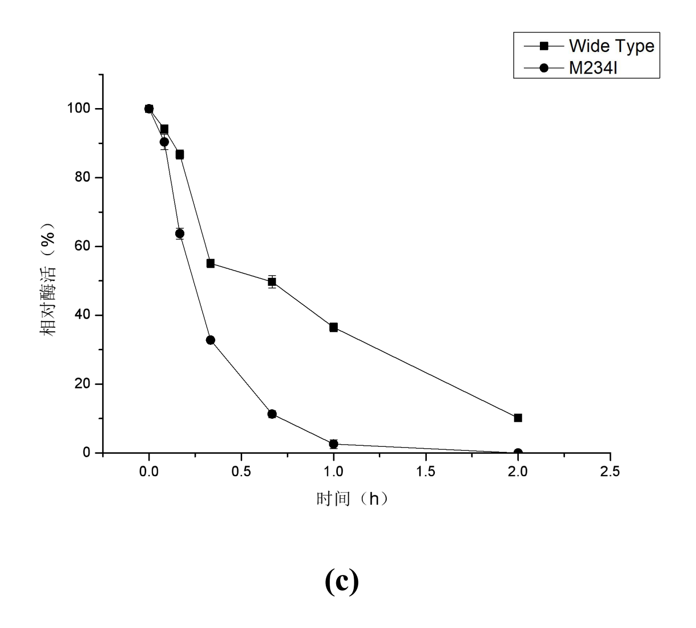
Fig.2 The optimum temperature of wild-type and the mutant M234I β-CGTase



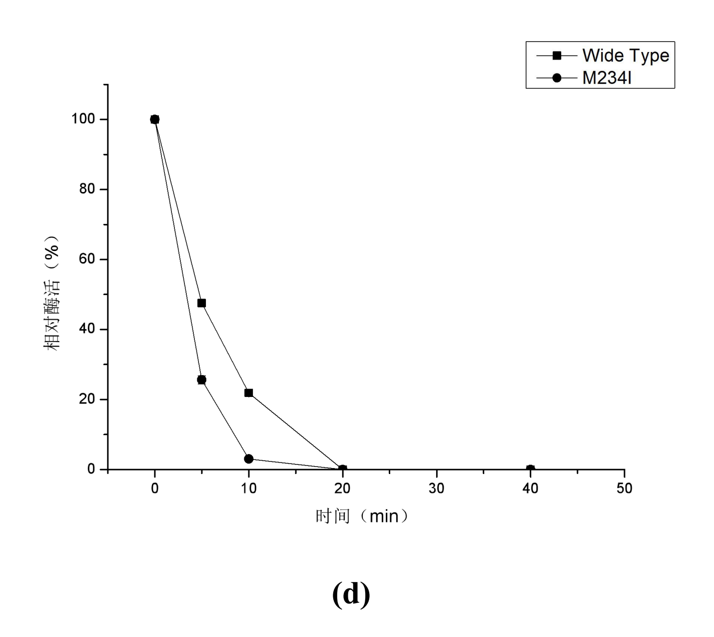
(a)



(b)



(c)



(d)

图 3 野生型和突变体 M234I β-CGTase 的温度稳定性

Fig.3 The stability of wild-type and the mutant M234I β-CGTase over temperature (a)45 ℃；(b)50 ℃；(c)55 ℃；(d) 60 ℃

2.7.2 最适 pH 及 pH 稳定性分析

突变体酶 M234I 和野生型β-CGTase 的最适 pH 及 pH 稳定性测定结果如图 5 和图 6 所示。由图 5 可知，突变体 M234I 和野生型β-CGTase 的最适 pH 均为 6.0 。而由图 6 可知，野生型和突变体 M234I β-CGTase 在 pH 5.5~8 时相对酶

活均能保持在 90%以上，而当低于 pH 5.5 时，两者都容易快速失活，可见两者的 pH 稳定性差别不大。

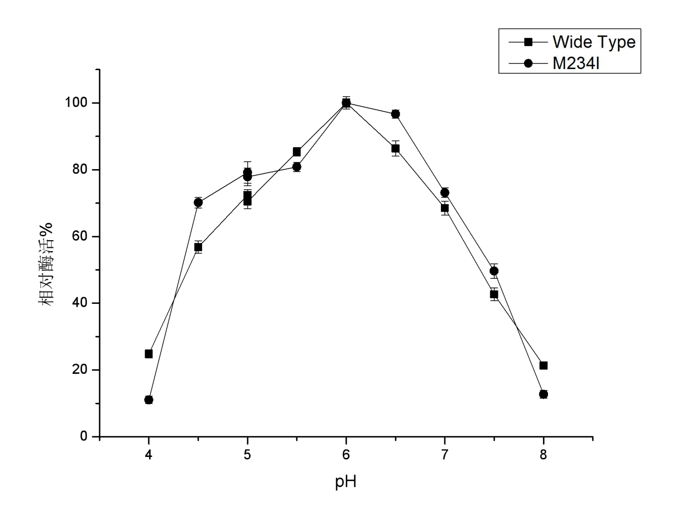


图 4 野生型和突变体 M234I β-CGTase 的最适 pH

Fig.4 The optimum pH of wild-type and the mutant M234I β-CGTase

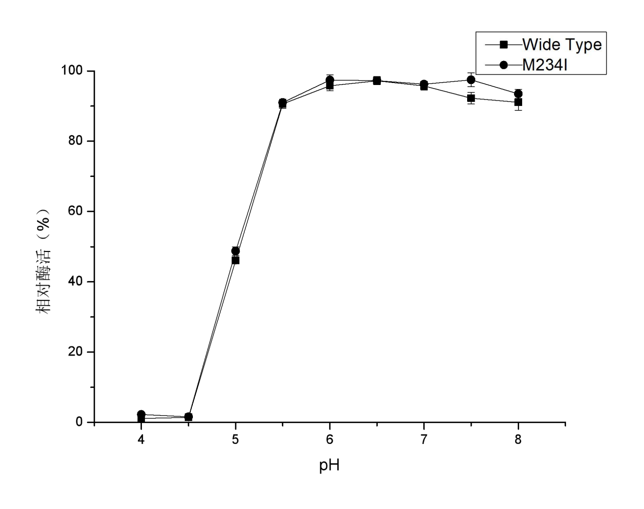


图 5 野生型和突变体 M234I β-CGTase 的 pH 稳定性

Fig.5 The stability of wild-type and the mutant M234I β-CGTase over pH

2.8 突变体 M234I 在海藻糖制备中的应用

按 1.2.7 所述方法进行海藻糖酶转化。不同加酶量的酶转化结果如图 10 所示。由图 10 可知，当加酶量为 2.4 U/mL 时当使用 *B. circulans* 251 来源的野生型β-CGTase 时，酶反应产物糖化后经 HPLC 检测得海藻糖产量最高为 143.8 g/L，其转化率为 71.9 %；而使用突变体 M234I β-CGTase 时，反应得到的海藻糖产量最高为 149.8 g/L，其转化率可达 74.9 %。该反应产物中葡萄糖、麦

芽糖和海藻糖含量如表 4 所示，麦芽糖含量有所降低，而葡萄糖和海藻糖含量有所上升。

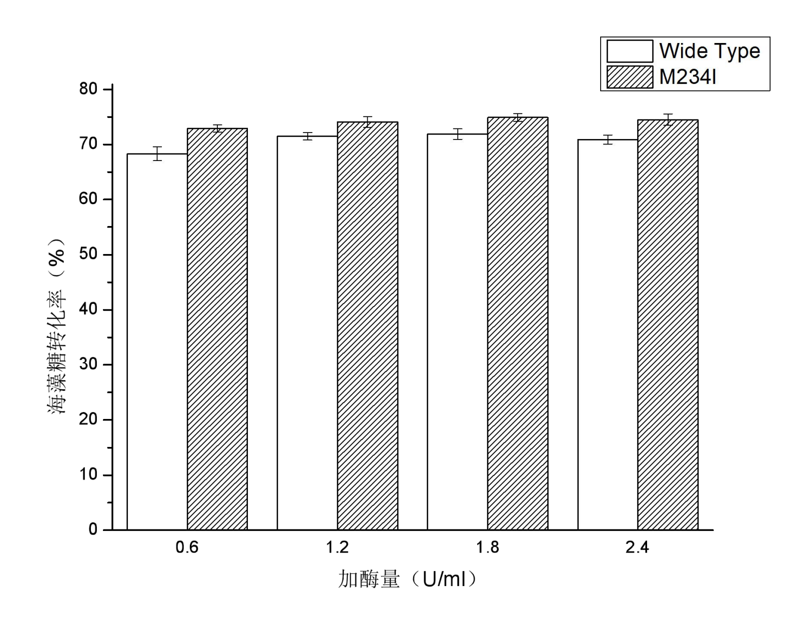


图 6 不同加酶量下的海藻糖转化率

Fig.6 Trehalose yield under different enzyme dosages

表 4 糖化前的反应体系中的葡萄糖、麦芽糖和海藻糖含量

Table 4 Glucose, maltose and trehalose content in the reaction system before saccharification

Enzyme	Glucose (g/L)	Maltose (g/L)	Trehalose (g/L)
Wild type	18.1	28.1	138.3
M234I	19.2	23.5	142.6

2.7 突变位点分析

从 PDB 数据库中获取野生型β-CGTase 蛋白质三维结构(PDB ID：1CXK)，，发现突变位点 M234I 位于底物结合位点+1 位点附近的一段 loop 上，而参与受体葡萄糖残基结合的 H233 同样也在该 loop 上[12]。利用 Amber 的 cpptraj 获得野生型与突变体 M234I 的动力学轨迹的平均结构（图 8），并将野生型与突变体 M234I 的平均结构与底物分子进行对接（图 9），发现当 M234 突变为 I234 时，该 loop 的构象发生了一定改变，改变后的 loop 区域更靠近受体结合区域[12]，突变体 M234I 的 H233 位点与受体底物麦芽糖形成的氢键距离（2.9Å，图 9（A））较野生型的 H233 形成的距离（3.3Å，图 9（B））更近，这可能在

一定程度上改善了 CGT 酶与受体底物麦芽糖之间的结合。

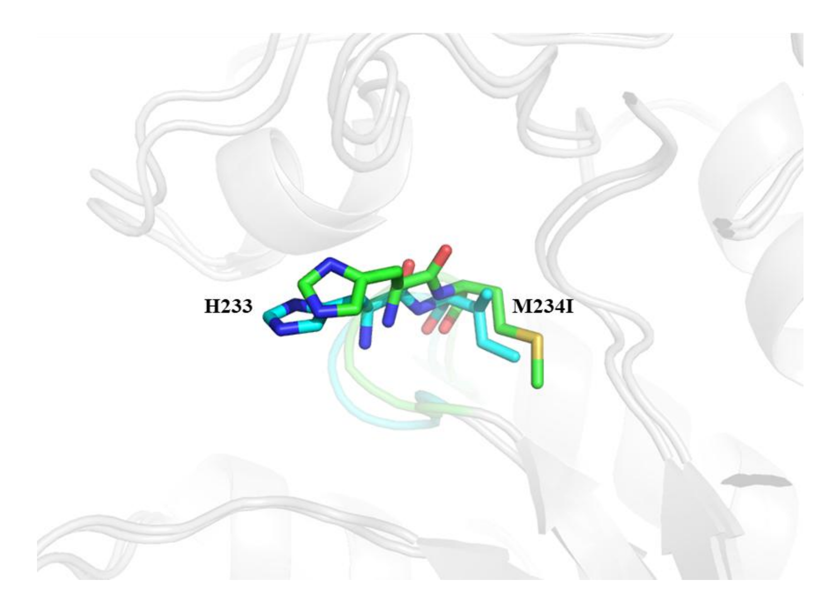
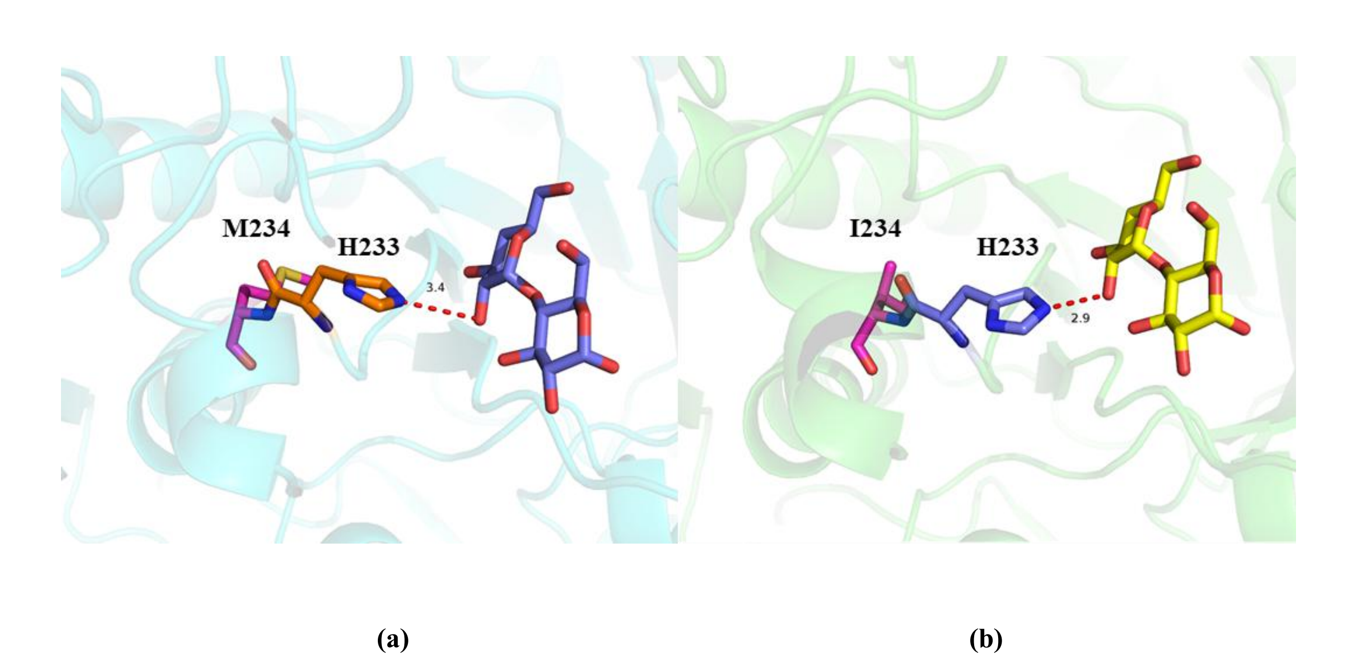


图 7 野生型与突变体 M234I β-CGTase 动力学轨迹的平均结构，绿色表示野生型的 loop 区域和残基，蓝色表示突变体 M234I 的 loop 区域和残基

Fig.7 The average structure of the wild-type and mutant M234I β-CGTase kinetic trajectories, the green part is the wild type loop region, and the blue part is the loop region of the mutant M234I



(a) (b)

图 8 野生型（a）与突变体 M234I(b) β-CGTase 平均结构的受体底物对接模型

Fig.8 Model of *B. circulans* 251 CGTase variants containing a docked structure of maltose (a)M234I (b)Wide Type

3 结论

本研究将 *B. circulans* 251 来源的β-CGTase应用于海藻糖制备，使海藻糖转化率从50.4%提高至71.9 %。分析酶反应产物发现体系中仍剩余较多的麦芽糖，若能进一步提高β-CGTase对麦芽糖的受体亲和性，则有利于进一步提高底物利用率以增加转化率，为此本研究将 *B. circulans* 251 来源的β-CGTase基因*β-cgt*作为模板，以易错PCR为方法进行基因的定向进化，结合高通量筛选技术，经过一系列的初筛、复筛最终获得了一株在歧化反应中对麦芽糖亲和性提高的突变体酶M234I，在歧化反应中以麦芽糖为受体时的亲和性明显提高，K_m为0.2582 mM，为野生型的54.4%。测定了突变体M234I的酶学性质，其最适温度和最适pH较野生型差别不大，温度稳定性有所降低。在将该突变体应用于多酶体系复配生产海藻糖的转化实验中，反应结束后的体系中麦芽糖含量有所降低，同时最终获得的海藻糖的转化率从71.9 %提高至74.9 %，对以淀粉为底物生产海藻糖的研究具有一定意义。

参考文献

[1] 吴敬，顾正彪，陈坚. 环糊精葡萄糖基转移酶的制备与应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2011, 1-5.
Wu J, G Z B, Chen J. Preparation and application of cyclodextrin glycosyltransferase. Beijing: Chemical Industry Press 2011:3-4
[2] Ba V D V, Leemhuis H, Kralj S, et al. Hydprophobic amino acid residues in the acceptor binding site are main determinants for reaction mechanism and specificity of cyclodextrin-glycosyltransferase.[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(48):44557-62.
[3] Kelly R M, Dijkhuizen L, Leemhuis H. The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2009, 84(1): 119-133.
[4] 李兆丰，顾正彪，堵国成，等. 环糊精葡萄糖基转移酶的结构特征与催化机理[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(6): 144-150.
Li Z F , Gu Z B, Du G C, et al. Structural Characteristics and Catalytic Mechanisms of Cyclodextrin Glycosyltransferase[J]. China Biotechnology, 2010, 30(6):144-150.
[5] Brunei C, Lamare S, Legoy M D. Studies of specific cyclodextrin production starting from pure maltooligosaccharides using Thermoanaerobacter sp. Cyclodextrin Glycosyltransferase[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 1998, 16(4): 317-327.

[6] Jemli S, Messaoud E B, Ayadi-Zouari D, et al. A β-cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated PaeniB. pabuli US132 strain: purification, properties and potential use in bread-making[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 34(1): 44-50.
[7] Lee Y H, Baek S G, Shin H D, et al. Transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase in the attrition coupled reaction system using raw starch as a donor[J]. Korean Journal of Applied Microbiology & Biotechnology, 1993, 6(27):801-815.
[8] 李才明. β-环糊精葡萄糖基转移酶在枯草杆菌中的分泌表达及其热稳定性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
Li C M. Secretory expression in Bacillus subtilis and thermostability of β-cyclodextrin glycosyltransferase[D]. Wuxi: Jiangnan University,2014
[9] Plou F J, Martín M T, de Segura A G, et al. Glucosyltransferases acting on starch or sucrose for the synthesis of oligosaccharides[J]. Canadian journal of chemistry, 2002, 80(6): 743-752.
[10] MartíN M T, Cruces M A, Alcalde M, et al. Synthesis of maltooligosyl fructofuranosides catalyzed by immobilized cyclodextrin glucosyltransferase using starch as donor[J]. Tetrahedron, 2004, 60(3):529-534.
[11] Mukai K, Tabuchi A, Nakada T, et al. Production of trehalose from starch by thermostable enzymes from Sulfolobus acidocaldarius[J]. Starch ‐ Stärke, 1997, 49(1): 26-30.
[12] van der Veen B A, Leemhuis H, Kralj S, et al. Hydrophobic amino acid residues in the acceptor binding site are main determinants for reaction mechanism and specificity of cyclodextrin-glycosyltransferase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(48): 44557-44562.
[13] 杨玉路, 王蕾, 陈晟, 等. 重组 β-环糊精葡萄糖基转移酶生产 β-环糊精的工艺条件优化[J]. 生物技术通报, 2014, 8: 175-181.
Yang Y L, Wang L, Chen S, et al. Optimization of β-cyclodextrin Production by Recombinant β-cyclodextrin Glycosyltransferase[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(8):175-181.
[14] Uitdehaag J C, Mosi R, Kalk K H, et al. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the alpha-amylase family[J]. Nature Structural Biology, 1999, 6(5):432.
[15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical biochemistry, 1976, 72(1-2): 248-254.